Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Hochspannungselektrophorese der Erythrozyten-Pyruvatkinase (ATP: Pyruvat-Phosphotransferase E.C. 2.7.1.40.)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Andreas Schalhorn
aus Berlin

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0094

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Hochspannungselektrophorese der Erythrozyten-Pyruvatkinase (ATP: Pyruvat-Phosphotransferase E.C. 2.7.1.40.)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Andreas Schalhorn
aus Berlin

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Professor Dr. G.W. Löhr
(Professor Dr. H.-E. Bock)

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Bierich

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Einleitung	1
	1. Begriff der Pyruvatkinase	1
	2. Nachweis der Pyruvatkinase	2
	3. Darstellung der Pyruvatkinase	3
	4. Chemische und physikalische Eigenschaften	3
	5. Bedeutung der Pyruvatkinase für den Erythrozytenstoffwechsel	4
	6. Klinisches Bild des Pyruvatkinasemangels	6
	7. Zielsetzung der Elektrophorese-Versuche	6
II.	Methodik	8
	1. Herstellung des Hämolysats	8
	2. Optischer Nachweis im Photometer	9
	3. Nachweis der Pyruvatkinase auf der Elektrophorese-Folie	10
	4. Photographie der Ergebnisse	12
	5. Elution der Pyruvatkinase aus den Folien	13
	6. Ammoniumsulfat-Fällung der Pyruvatkinase	14
	7. Methodik der Hochspannungselektrophorese	14
III.	Ergebnisse	18
	1. Elektrophoresen gelösten Ammoniumsulfat-Niederschlags	18
	2. Hochspannungselektrophorese der Normal-Erythrozyten-Pyruvatkinase	20
	3. Bestimmung der Enzymaktivität nach Elution aus den Acetatfolien	25
	4. Hochspannungselektrophoresen bei Pyruvatkinase-Mangel	25

Seite

IV. Diskussion 31

V. Zusammenfassung 35

VI. Literaturverzeichnis 36

I. EINLEITUNG

1. Begriff der Pyruvatkinase

Pyruvatkinase $(PK)^+$, ATP: Pyruvat-Phosphotransferase E.C. 2.7.1.40, ist ein Kauptkettenenzym der Glykolyse und katalysiert die Umwandlung von Phosphoenolpyruvat $(PEP)^+$ in Pyruvat unter gleichzeitiger Phosphorylierung von Adenosin-diphosphat $(ADP)^+$ zu Adenosin-tri-phosphat $(ATP)^+$. Falls ADP fehlt wird keine Phosphorsäure durch PK vom PEP abgespalten (24). Die PK katalysiert also die "zweite Phosphat übertragende Reaktion der Glykolyse". PK ist identisch mit Fluorokinase, die die Reaktion $ATP + F^- + HCO_3^- \rightleftarrows ADP + PO_3F^{2-} + CO_2$ katalysiert (51).

Für die Umwandlung von PEP in Pyruvat sind zweiwertige Metallionen wie Mg^{++} oder Mn^{++} erforderlich (24, 7, 23). Calcium-Ionen hemmen die Reaktion, das Ausmaß der Hemmung ist dabei abhängig von der Konzentration an K^+-Ionen, da diese einen Teil der durch Ca^{++}-Ionen bedingten Hemmung aufzuheben vermögen (16). Weiterhin sind einwertige Ionen wie K^+, NH_4^+ oder Rb^+ erforderlich (9, 23).

Die Annahme Meyerhofs, wonach die durch Pyruvatkinase bewirkte Abspaltung von Phosphorsäure und deren Übertragung auf ADP nicht reversibel sei, konnte von Lardy und Ziegler (23) widerlegt werden, indem sie zeigten, daß das Fehlen von Kalium-Ionen die Reversibilität verhinderte. Das Gleichgewicht liegt überwiegend auf der Seite des Pyruvats (33).

+ Folgende Abkürzungen wurden in dieser Arbeit benützt:
ADP = Adenosindiphosphat, DPGM = Diphosphoglyceromutase,
ATP = Adenosintriphosphat, FP_2 = Fruktose-1, 6-diphosphat,
GSSG-Red = Glutathionreduktase, LDH = Laktatdehydrogenase,
$NADH_2$ u. NAD = reduziertes bzw. oxydiertes Nikotinamidadenin-dinukleotid, $NADPH_2$ u. NADP = reduziertes bzw. oxydiertes Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat, PK = Pyruvatkinase, TRAP = Triäthanolamin-HCl-Puffer, PEP = Phosphoenolpyruvat.

Die durch Pyruvatkinase katalysierte Reaktion läßt sich wie folgt formulieren:

$$\text{(I)} \quad \text{PEP} + \text{ADP} \underset{\text{PK}}{\overset{K^+,\ MG^{++}}{\rightleftharpoons}} \text{Pyruvat} + \text{ATP}$$

2. Nachweis der PK

Ein optischer Test zum Nachweis der Pyruvatkinase wurde zuerst von Negelein entwickelt (35); das Manuskript ging im Krieg verloren, so daß wir auf die Testangaben in der Arbeit von Kubowitz und Ott, die sich aber auf Negelein berufen, angewiesen sind (35). Wir benützten für unsere Bestimmungen den Test nach Th. Bücher et al. (1), der aber im wesentlichen dem Test von Negelein entspricht.

Es handelt sich um eine zusammengesetzte optische Nachweisreaktion im Eppendorfphotometer bei 366 mμ. Das aus Reaktion I entstehende Pyruvat wird in der zweiten, der Indikator-Reaktion, unter Anwesenheit von $NADH_2$ und LDH in Laktat umgewandelt. Es handelt sich um eine Indikatorreaktion, da die Konzentrationsabnahme an $NADH_2$, die sich in einer Extinktionsabnahme im Eppendorf-Photometer bei 366 mμ äußert, proportional der PK-Aktivität ist. In Formeln stellt sich der PK-Nachweis also folgendermaßen dar:

$$\text{(I)} \quad \text{PEP} + \text{ADP} \underset{\text{PK}}{\overset{K^+,\ Mg^{++}}{\rightleftharpoons}} \text{Pyruvat} + \text{ATP}$$

$$\text{(II)} \quad \text{Pyruvat} + NADH_2 \underset{\text{LDH}}{\rightleftharpoons} \text{Laktat} + \text{NAD}$$

Der Test wird in einer Kuvette mit d = 1,0 cm in 0,05 molarem Triäthanolamin-HCl-Puffer bei pH 7,5 und einer Temperatur von 25° C ausgeführt. Einzelheiten über Zusammensetzung und Menge der Lösungen sind im methodischen Teil beschrieben.

3. Darstellung der PK

Negelein gelang als erstem die Darstellung der Pyruvatkinase aus Rattenmuskulatur (35, 22). PK aus Kaninchenmuskel wird nach Methoden von Kornberg et al. (20) und Kachmar et al. (16) sowie nach einem kombinierten Verfahren zur Gewinnung verschiedener Enzyme nach Th. Bücher und Mitarbeitern (1) gewonnen. Kubowitz und Ott (22) isolierten PK aus Menschenmuskeln; einen Weg zur Darstellung aus Bäckerhefe geben Washio et al. an (58).

4. Chemische und physikalische Eigenschaften der PK

Die Angaben über die chemischen und physikalischen Eigenschaften der PK decken sich nicht bei allen Autoren (9, 43, 44, 45).

Aktivatoren: Mg^{++}, Mn^{++}, K^{+}, Rb^{+}, NH_4^{+} (44, 9, 23).

Hemmstoffe: Ca^{++}, Na^{+}, Li^{+}, pClMB = p-Chloromercuribenzoat, Jodacetamid.

pH-Optimum: Menschenmuskel pH 7, 5; Kaninchenmuskel pH 7, 2 - 7, 8 (46).

Inversionspunkt: pH 6, 6 (44), pH 5, 98 (45).

Gleichgewichtskonstante: 30° C, pH 7, 72: $\frac{ATP \cdot Pyruv.}{ADP \cdot PEP} = 2200$.

Wechselzahl: Kaninchenmuskel: 6000 Mol Phosphorsäure werden pro 100000 g Enzymprotein bei 20° C und pH 6, 77 in einer Minute von PEP auf ADP übertragen (46). Rattenmuskel: 6500 Mol/min (46).

Michaeliskonstanten: Die Angaben variieren bei den verschiedenen Autoren etwas (43, 44): PEP: $7,8 \cdot 10^{-5}$ (44), $8,6 \cdot 10^{-5}$ (43). ADP: $3,6 \cdot 10^{-4}$. ATP: $8,6 \cdot 10^{-4}$. Pyruvat: $1,0 \cdot 10^{-2}$ (43, 44). K^{+}, Rb^{+}, NH_4^{+}: $1,1 \cdot 10^{-2}$.

Molekulargewicht: Rattenmuskel: 166000 (9), Kaninchenmuskel: 237000 (57). Neuere Versuche von Blume et al. (3) zur Bestimmung des Molekulargewichts der Erythrozyten-PK durch Dextran-Gelfiltration über Sephadex G 200 brachten eine Reihe molekular unterschiedlicher Fraktionen, die zum überwiegenden Teil als Oligomere eines Monomeren mit dem Molekulargewicht 59000 angegeben werden (57).

Harnstoff: In Harnstoff zerfällt die PK in 2 trennbare Komponente (43, 46, 34). Die enzymatische Aktivität geht bei 2, 5 m Harnstoff völlig verloren, kann aber durch Dialyse zu 80% wiedergewonnen werden; bei 5, 0 m Harnstoff ist die Inaktivierung irreversibel.
Das Absorptionsspektrum zeigt sein Maximum bei 280 mμ (43, 46). Die spezifische Extinktion der PK aus Menschen- und Kaninchenmuskel beträgt 0, 54, aus Rattenmuskel 0, 55. PK enthält 1, 6% Schwefel und 0, 06% Phosphor.

5. Bedeutung der Pyruvatkinase für den Stoffwechsel

Der Erythrozyt verliert mit fortschreitender Reifung alle wichtigen Enzymsysteme, so daß Nukleinsäure-, Protein-, Häm- und Lipidsynthese verloren gehen (31, 32). Funktionstüchtig bleiben nur noch Hexosemonophosphat-Zyklus und Glykolyse. Letztere ist somit der einzige, bescheidene, Energielieferant der reifen roten Blutzelle. Der Abbau von 1 Mol Glukose bis zum Laktat ergibt 2 anstatt 36 Mol ATP, wenn der Abbau über Trikarbonsäure-Zyklus und Atmungskette vollständig ist. Jede Störung der Glykolyse ist daher von erheblicher Bedeutung für den Erythrozyten, da ein dadurch bedingter ATP-Mangel über Störungen des Kationentransports zur Hämolyse führen kann (40).

Nun gibt es eine Reihe von hämolytischen Anämien, die sich nach Untersuchungen von Dacie und Selwyn von den bereits früher beschriebenen Erythrozytopathien wie z.B. Familiärer Kugelzellikterus oder Thalasämie durch folgende gemeinsame Merkmale unterscheiden (11, 12):

1. Fehlen einer Sphärozytose,
2. kein abnormes Hämoglobin,
3. Splenektomie bringt meist keinen Erfolg.
4. Auftreten meist bei Individuen nordeuropäischer Herkunft.

Weitere Untersuchungen von Selwyn und Dacie (48), sowie de Gruchy, Santamaria und Parson (15) ermöglichten eine Einteilung dieser nichtsphärozytären hämolytischen Anämien in zwei Typen: Dabei ist Typ I nach

Dacie im wesentlichen dadurch gekennzeichnet, daß die erhöhte Autohämolyse durch Zusatz von Glukose, Nukleosiden und ATP korrigiert werden kann. Bei Typ II nach Dacie ist lediglich ATP in der Lage, die Hämolyse zu verhindern, Glukose und Nukleoside bleiben ohne Wirkung.

Untersuchungen der Enzymaktivitäten der Erythrozyten ermöglichten noch eine weitere Differenzierung der hämolytischen Anämien des Typs II nach Dacie: 1961 konnten Valentine, Tanaka und Miwa (54, 49) und 1962 Löhr und Waller (55, 25) bei Patienten weißer Rassen eine erhebliche Verminderung der PK-Aktivität feststellen. Dieser "inborn error of metabolism", der erste und zugleich häufigste Enzymdefekt des Embden-Meyerhof-Zyklus, von dem in den letzten 7 Jahren mehr als 100 Fälle berichtet wurden, findet sich bei Nord- und Mitteleuropäern und Nordamerikanern weißer Rassen (3). Nach Untersuchungen von Tanaka et al. (49, 50) und Löhr et al. (27, 28) ist ein autosomal-rezessiver Erbgang des Leidens wahrscheinlich. Dabei beträgt die Häufigkeit für homozygote Defektträger in Deutschland nach neueren Untersuchungen von Blume et al. (5) 0, 005% und für heterozygote 1, 4%. Als weitere Untergruppen wurden unter anderem Anämien mit einem Diphosphoglyceromutase-Mangel (DPGM-Mangel) (26, 27, 41, 42) bzw. mit einem Glutathionreduktase-Mangel (GSSG-Red.) gefunden (25, 26).

Bei homozygoten Patienten mit PK-Mangel lagen die Enzymaktivitäten unter 30%, in manchen Fällen sogar unter 10% der Normalwerte von $41,7 \pm 6,3$ U/10^{11} Erythrozyten. Insgesamt waren die Werte in den Untersuchungen von Löhr und Waller wesentlich höher (28), da diese im Gegensatz zu Valentine höhere d.h. optimale PEP-Konzentrationen in den Test einsetzten. Mit großen Substratkonzentrationen ließ sich auch bei homozygoten Defektträgern fast die Hälfe der Normalaktivität erreichen, was weniger für eine quantitative als qualitative Veränderung des Enzymproteins der PK spricht (28, 56). Die übrigen Erythrozytenfermente zeigten normale Aktivitäten (28, 49); die Leukozyten-PK war nicht erniedrigt.

Infolge des Mangels an PK-Aktivität ist die Umwandlung von PEP und ADP in Pyruvat und ATP erheblich vermindert. Diese Störung zeigt sich in folgenden Veränderungen der Stoffwechselgrößen (3, 28, 55, 56). Der ATP-Gehalt

des Erythrozyten ist meist erniedrigt (3); es wurden aber auch Fälle mit normaler oder sogar erhöhter Konzentration an AT P beschrieben (17, 53). Die glykolytische Umsatzrate ist erniedrigt. PEP, 2, 3-Diphosphoglyzerat und 3-Phosphoglyzerat sind erhöht, Pyruvatkonzentration und Laktatbildung erniedrigt oder im Normbereich.

6. Klinisches Bild der Pyruvatkinase-Mangels

Klinisch findet sich bei PK-Mangel das Bild eines chronischen hämolytischen Geschehens mit Ikterus, der besonders bei Stress-Situationen vermehrt auftreten kann. Meist besteht kein direkter Zusammenhang zwischen Mangel an PK und Schwere der Anämie. Sie ist meist kompensiert und macht nur in wenigen Fällen, insbesondere nach hämolytischen Krisen, Bluttransfusionen erforderlich (3). Manifest wird die Krankheit im Jugendalter, es sind aber auch Fälle bekannt, bei denen bereits bald nach der Geburt eine starke hämolytische Anämie auffällt (50). Zuweilen tritt die Anämie erst im Erwachsenenalter auf. Häufig finden sich Milzvergrößerung und vermehrte Gallensteinbildung. Der Grad der Anämie schwankt in starkem Maße zwischen 5 und 11, 5 mg% (50). Beim Normochromie beträgt der Durchmesser der Erythrozyten etwa 8 µ, es finden sich aber eine wechselnd starke Anisozytose und Poikilozytose. Retikulozytose mäßigen bis starken Ausmaßes ist immer vorhanden, die nach Splenektomie oft erheblich ansteigen kann (17). Serumbilirubin ist je nach Schweregrad der Hämolyse erhöht, der Anstieg von Serumeisen und LDH ist fast immer gering. Die Lebensdauer der Erythrozyten ist nach isotopendiagnostischen Untersuchungen von Oski et al. auf etwa 1/4 verkürzt (37).

7. Zielsetzung der Elektrophorese-Versuche

Wegen der Bedeutung der PK für die Energiegewinnung der Erythrozyten erschienen uns Untersuchungen über das Verhalten der PK bei Hochspannungselektrophoresen von großem Interesse zu sein, zumal zu Beginn unse-

rer Untersuchungen 1964 noch keine Ergebnisse über die Elektrophorese der Erythrozyten-PK vorlagen. Besonders sollte geklärt werden, ob die Elektrophorese eine Trennung der PK in mehrere Enzym-Protein-Banden ermöglichte, wie es Wieland und Pfleiderer schon früher für die Laktatdehydrogenase verschiedener Organe des Menschen gelang (59, 62). Die hochspannungselektrophoretischen Untersuchungen sollten also die Eigenschaften der normalen Pyruvatkinase darstellen, um dann bei der Elektrophorese der Hämolysate von Personen mit Pyruvatkinasemangel gegebenenfalls Unterschiede darzustellen, die vielleicht zu einer Klärung des Mechanismus dieses Defekts beitragen könnten.

Da zum Beginn meiner Untersuchungen keine Angaben über den Nachweis der PK auf Elektrophoresemedien vorhanden waren, bestand ein wesentlicher Hauptteil dieser Arbeit darin, einen nicht zu komplizierten Nachweis für die Pyruvatkinase auszuarbeiten.

II. METHODIK

1. Herstellung des Hämolysats

Wir verwandten bis auf wenige Ausnahmen venöses Zitratblut (1 Teil Zitrat, 3,8%, auf 4 Teile Blut) zur Herstellung des Hämolysats. Nach Abzentrifugieren der Erythrozyten vom Serum mit der Kühlzentrifuge (3000 Upm, 3 Min., 4° C) wurden die Erythrozyten 3mal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Zum Schluß wurden sie für 5 Minuten bei 3500 - 4000 Upm zentrifugiert und anschließend die überstehende NaCl-Lösung ebenso wie die oberste Erythrozytenschicht, die auch die Leukozyten enthielt, abgesaugt. Wir erhielten so eine sehr konzentrierte Erythrozytensuspension.

Da die Digitonin-Hämolyse die selben Enzymaktivitäten bringt wie die Gefrierhämolyse und dabei wesentlich einfachher durchzuführen ist (29), verwandten wir zur Hämolyse gesättigte Digitonin-Lösung (1 g Digitonin auf 100 ml bidest).

2,0 ml Erythrozytensuspension,
2,6 ml bidest,
0,4 ml Digitonin-Lösung

wurden gut durchgemischt und für etwa 6 Stunden im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt und anschließend mit der Kühlzentrifuge ebenfalls bei 4° C für 30 min. bei 15000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und für die Elektrophoreseversuche verwandt. Das auf diese Weise hergestellte Hämolysat hatte bei Normalpersonen immer mehr als 1 U/ml Hämolysat, also eine sehr hohe Aktivität.

2. Nachweis der Pyruvatkinase im optischen Test

Nach dem weiter oben bereits beschriebenen Reaktionsschema müssen in unserem Testansatz für die durch PK katalysierte Hauptreaktion (I) PEP, ADP, Magnesium- und Kalium-Ionen und für die Indikatorreaktion (II) $NADH_2$ und LDH vorhanden sein. Als Pufferlösung verwandten wir 0,05 Mol Triäthanolamin-HCl-Puffer vom pH 7,5 (45). Wir verwandten folgende Lösungen:

1,000 ml TRAP, pH 7,5; 0,05 molar

0,100 ml 1,0 m KCl = $1,0 \cdot 10^{-4}$ Mol

0,050 ml 0,5 m $MgCl_2$ = $2,5 \cdot 10^{-5}$ Mol

0,010 ml $NADH_2$ (Stammlösung: 25 mg Trockensubstanz mit bidest auf 1,0 ml) = $2,9 \cdot 10^{-7}$ Mol

0,050 ml ADP (Stammlösung: 20 mg Trockensubstanz mit bidest auf 1,0 ml) = $1,6 \cdot 10^{-6}$ Mol

0,025 ml Hämolysat (oder je nach Konzentration des Hämolysats mehr oder weniger Einsatz)

0,005 ml LDH (5 mg Enzymprotein/ml)

0,075 ml PEP als Startersubstanz (Stammlösung: 25 mg Trockensubstanz mit bidest auf 2,0 ml) = $4,2 \cdot 10^{-6}$ Mol+)

KCl, $MgCl_2$, $NADH_2$, ADP, Hämolysat und LDH wurden zusammen mit TRAP in die Kuvette gegeben und die Reaktion nach Temperaturausgleich mit PEP gestartet.

Die Aktivität der PK wurde in Internationalen Einheiten pro 10^{11} Erythrozyten (U/10^{11} Erythr.) berechnet. Nach E. Racker hat die Enzymmenge die Aktivität einer Internationalen Einheit, die $1 \cdot 10^{-6}$ Mol Substrat, in unserem zusammengesetzten Test $NADH_2$, pro Minute umsetzt. Dabei sind optimale Bedingungen, was Substratkonzentration, Ionenstärke und pH des Puffers anbelangt, und eine Temperatur von 25° C vorausgesetzt (2).

Da der Extinktionskoeffizient von $NADH_2$ bei einer Schichtdicke von 1,0 cm und einem Volumen von 1,0 ml bei 366 mμ 3,30 cm^2/Mol beträgt, entspricht

+) Die Substanzen $NADH_2$, ADP, PEP und LDH wurden von der Firma Boehringer, Mannheim, geliefert.

eine Extinktionsänderung von $\Delta E = 0,1$ einem $NADH_2$-Umsatz von 0,303 Mol. Unter Berücksichtigung von Testvolumen, Verdünnungsfaktor, Schichtdicke der Kuvette und Hämolysateinsatz läßt sich die Aktivität der PK/ml Hämolysat folgendermaßen berechnen:

$$PK = \frac{\Delta \text{ Ext.} \cdot \text{Testvol. (ml)}}{\text{min} \cdot \varepsilon_{NADH_2} \cdot d_{\text{Schichtdicke (cm)}} \cdot \text{ml Hämolysat}}$$

Unter Berücksichtigung der bei der Hämolysatherstellung entstehenden Verdünnung läßt sich dann sehr leicht die PK-Aktivität erreichnen. Für Erythrozyten von Normalpersonen ergibt sich eine Aktivität von $41,7 \pm 6,3$ U/10^{11} Erythrozyten. Unser Hämolysat, das wir für die Elektrophorese-Versuche verwandten, hatte im allgemeinem eine Aktivität von etwa 1 U/ml.

3. Nachweis der Pyruvatkinase auf der Elektrophorese-Folie

Zum Nachweis der PK auf der Folie benutzten wir im Prinzip dieselbe Methode und dieselben Reagenzien wie im Photometernachweis. Während wir im Photometer die Abnahme der Extinktion bei der Umwandlung von $NADH_2$ in NAD messen, betrachten wir hier unter UV-Licht die gelblich-grünliche Fluoreszenz des $NADH_2$, die an allen Stellen, an denen sich PK befindet, nach Eintauchen des Streifens in die Testlösung verschwinden sollte. Die PK stellt sich also unter UV-Licht in einem dunkelen Raum als dunkeler Streifen inmitten der gelb-grünen Fluoreszenz des $NADH_2$ dar.

Die Schwierigkeiten lagen nun darin, die Konzentration der Substrate so zu wählen, daß auf dem Elektrophoresestreifen eine genügend hohe Konzentration an Substrat für einen optimalen Nachweis vorhanden war. Der Gehalt an $NADH_2$ mußte im Vergleich zum Photometer-Test erheblich erhöht werden, damit die Fluoreszenz des in die Testlösung getauchten Streifens unter UV-Licht so stark wurde, daß ein deutlicher Kontrast zu den schwarzen Streifen der PK vorhanden war. Konzentrationen von 0,1 ml $NADH_2$-Lösung auf 1,0 ml Test-Lösung zeigten zwar eine hervorragende Fluoreszenz, die Aktivität der PK reichte aber nicht zu einem genügenden $NADH_2$-Umsatz

aus, so daß sich die PK nicht darstellen ließ. Die zu hohe Konzentration an $NADH_2$ führte auch zu einer Hemmung der PK. Folgende Zusammensetzung der Testlösung erwies sich schließlich für den Nachweis am günstigsten:

11,40 ml 0,05 m TRAP pH 7,5
2,60 ml 1 m KCl = $2 \cdot 10^{-3}$ Mol
1,00 ml 0,5 m $MgCl_2$ = $5 \cdot 10^{-4}$ Mol
3,00 ml ADP (60 mg Trockensubstanz mit bidest auf 3,0 ml)
= $93 \cdot 10^{-6}$ Mol
1,00 ml $NADH_2$ (25 mg Trockensubstanz mit bidest auf 1,0 ml)
= $29 \cdot 10^{-6}$ Mol
1,60 ml PEP (20 mg Trockensubstanz mit bidest auf 1,6 ml)
= $91 \cdot 10^{-6}$ Mol

20,00 ml Stammlösung

Von dieser Stammlösung, die auch zu längerer Aufbewahrung eingefroren werden kann, wurden je Elektrophoresestreifen 2,0 ml genommen und mit 0,035 ml LDH versetzt. Die Streifen wurden möglichst schnell nach Herausnahme aus der Elektrophoresekammer, um eine zu starke Austrocknung und damit einen Aktivitätsverlust der PK zu verhindern, mit der Rückseite flach in die Testlösung gelegt und in ihr für 30 - 45 Sekunden belassen. Versuche, die Testlösung auf die Folien zu sprühen, ergaben eine wesentlich unregelmäßigere Fluoreszenz der Folie. Nach Herausnahme aus der Testlösung ließen wir die überflüssige Lösung abtropfen. Wenn wir nun den Streifen in normaler Zimmerluft liegen ließen, bekamen wir nur einen Nachweis, wenn wir sehr große Enzymaktivitäten, etwa gereinigte PK-Lösung der Firma Boehringer, Mannheim, auftrugen. Da die von uns aufgetragene Hämolysatmenge aber eine im Vergleich hierzu minimale Aktivität an PK, nämlich 0,010 - 0,015 U hatte, wurde der Streifen über eine Schüssel mit Wasser von 44° C gespannt, und für 30 Minuten in einen Brutschrank von 36 - 38° C gebracht. Dieses Verfahren hatte den Vorteil, daß ein zu schnelles Austrocknen der Folie und damit ein Stop der Nachweisreaktion der PK verhindert wurde, und die Temperaturerhöhung die Umsetzung von $NADH_2$ in NAD nach der RGT-Regel erheblich beschleunigte. So wurde die PK nach der Elektrophorese auch dann noch, in 2 Banden getrennt, nachgewiesen, wenn nur die geringe Menge von 0,005 U auf einer Startlinie von 2,5 cm Länge aufgetragen wurde.

Eine Fehlermöglichkeit dieser Nachweismethode besteht aber in einer zu hohen Konzentration an $NADH_2$, die u.U. einen Nachweis der gewanderten PK-Bande verhindern kann. Der Nachweis ist nur ein qualitativer, so daß wir ohne zusätzliche Untersuchungen nichts über das Ausmaß der PK-Aktivität aussagen können.

4. Photographie der Ergebnisse

Leider ist das $NADH_2$ in Zimmertemperatur nur sehr kurz haltbar, seine Fluoreszenz schwindet, und die PK-Bande hebt sich nicht mehr als dunkeler Streifen von gelb-grüner Umgebung ab. Wir photographierten daher unsere Ergebnisse und bedienten uns dabei folgender Methoden:

UV-Photographie: Da $NADH_2$ UV-Licht stärker absorbiert als NAD, schalteten wir durch ein Tageslicht-Filter alles sichtbare Licht aus und photographierten das durch den Elektrophoresestreifen fallende UV-Licht. PK enthaltende Stellen stellten sich dann auf dem Positiv als Helle Banden dar. Wir benutzten zur Ausschaltung des sichtbaren Lichts ein Tageslicht-Filter, ein "ultraviolett durchgängiges Schwarzglas" vom Typ UG 2 der Firma Jenaer Glaswerk Schott und Gen., Mainz. Das Filter hatte einen Durchmesser von 45 mm, eine Dicke von 2,5 mm und absorbierte Lichtwellen vor allem im Bereich von 400 - 700 mμ (13).

Fluoreszenz-Photographie: Da diese Methode bessere Ergebnisse, d.h. klarere Bilder ergab, photographierten wir die Fluoreszenz des $NADH_2$ bzw. deren Fehlen an den Stellen, an denen sich PK befindet. Da die UV-Strahlen, mit denen wir die Streifen durchfallend oder auffallend bestrahlten, einen genau entgegengesetzten Effekt haben, schalteten wir sie durch ein UV-Filter des Jenaer Glaswerk vom Typ GG 22 mit einem Durchmesser von 45 mm und einer Dicke von 2,5 mm aus (13).

Die Aufnahmen erfolgten mit einer Spiegelreflexkamera[+)] auf Adox-Film

---

[+)] Für die Überlassung der Kamera möchte ich Herrn Oberarzt Doz. Dr. F.W. Aly sehr herzlich danken.

LKB 14 mit einer Beleuchtung von 5 - 7, 5 Sekunden bei Blende 8 oder 5 Sekunden bei Blende 4. Mit dieser Methode ließ sich die PK immer hervorragend als schwarzer Strich auf dem Positiv darstellen.

5. Elution der Pyruvatkinase aus der Elektrophorese-Folie

Da der beschriebene PK-Nachweis nur eine qualitative Bestimmung der PK ermöglicht, versuchten wir, die PK-Banden nach dem Nachweis zu eluieren und dann ihre Aktivität im Eppendorf-Photometer zu bestimmen. Nachdem wir zunächst Versuche mit Puffern verschiedener Ionenstärken gemacht hatten, bewährten sich folgende Elutionsversuche am besten: Direkt nach Herausnahme des Streifens aus dem Brutschrank wurden die PK-Banden unter UV-Licht mit Kugelschreiber umrandet und möglichst schnell - um ein zu starkes Austrocknen zu vermeiden - in kleine Stückchen zerschnitten und in Gläschen mit je 1, 5 ml Triäthanolamin-HCl-Puffer (0, 05 molar, pH 7, 5) gebracht. Dabei sollen die ausgeschnittenen Streifen gleich breit sein, um gleiche Adsorptionsverhältnisse zu haben. Die Gläschen wurden nun für 3 Stunden in den Kühlschrank gestellt, damit sich die PK aus den Streifen gut heraus lösen konnte. Anschließend verwandten wir 0, 8 ml des Eluats für den Photometer-Test, der wie oben angegeben ausgeführt wurde. Nur wurden statt 1, 0 ml TRAP 0, 2 ml genommen, da ja das Eluat bereits genügend Pufferlösung enthielt.

Bei Versuchen, die PK schon nach halbstündiger Elutionsdauer im Photometer-Test zu bestimmen, fanden wir nur verschwindend geringe Mengen an PK wieder. Wenn die Elution länger als 3 Stunden dauerte, stieg die wiedergefundene Pyruvatkinase-Aktivität nicht weiter an; es erwies sich also eine Elutionsdauer von 2, 5 - 3 Stunden als optimal.

Diese Methode hat natürlich manche Fehlermöglichkeiten, und sicher geht bei den vielen Schritten vom Auftragen des Hämolysats auf die Folie bis zum Nachweis im Photometer ein großer Teil der PK-Aktivität verloren,

aber bei konstanten Bedingungen gibt sie doch die Möglichkeit, vergleichende Untersuchungen über die Aktivität der verschiedenen PK-Banden anzustellen.

6. Ammoniumsulfat-Fällung

Da das Hämoglobin wegen einer überreichen Menge die Elektrophorese im alkalischen Milieu stark behinderte, fällten wir das PK-Protein mit Ammoniumsulfat teilweise aus. Wir verwendeten dabei 250 - 300 mg festes $(NH_4)_2SO_4$. Den Niederschlag lösten wir mit der 1/3 - 1/2 der ursprünglichen Hämolysatmenge entsprechenden Menge an bidest oder Puffer. Da wir von der ursprünglichen Aktivität 60% im Niederschlag wiederfanden, erhielten wir für unsere Elektrophoreseversuche wesentlich höher konzentrierte Lösungen.

7. Elektrophorese

Wir verwendeten ein Elektrophoresegerät nach Wieland und Pfleiderer (60, 61), Vertrieb: Firma Hormuth, Inh. W.E. Vetter, Wiesloch.[+)] Bei dieser Apparatur werden die Elektrophoresestreifen auf eine Glasplatte, die von einem Methanol-Wasser-Gemisch gekühlt wird, gebracht. Somit ist auch bei sehr hohen Spannungen eine ausgezeichnete Wärmeableitung gewährleistet, so daß die Enzyme auch bei hohen Spannungen von 2000 Volt weitestgehend geschont werden und außerdem die Gefahr eines Austrocknens oder Durchbrennens des Streifens herabgesetzt wird.

Wir führten unsere Versuche auf Acetatfolien (Membranfolien) der Firma Schleicher u. Schüll durch. Wir entschieden uns vor allem deswegen für Acetatfolien, da die Adsorptionserscheinungen, die sich gerade bei der Elektrophorese hochmolekularer Substanzen auf Papierfolien sehr störend

---

[+)] Für die Überlassung der Elektrophoreseapparatur möchte ich Herrn Dr. U. Dold sehr herzlich danken.

bemerkbar machen, bei der Acetatfolie nahezu vollkommen fehlen, wie Untersuchungen von Kohn (18, 19) und Oriol-Bosch (36) ergaben. Daß die Acetatfolie hervorragend zur Elektrophorese von Enzymen geeignet ist, hatte bereits früher die hochspannungselektrophoretische Trennung der LDH verschiedener Organe und der Erythrozyten in Isoenzyme durch Wieland und Pfleiderer ergeben (62).

Die Folie wurde in die Pufferlösung fallen gelassen und war in kurzer Zeit durch den Sog der Kapillaren von unten benetzt; nach kurzem Untertauchen und leichtem Abtupfen mit Filterpapier wurde die Folie in die Elektrophoresekammer gelegt. Mit einer Gummiwalze wurden alle Luftblasen entfernt, so daß die Folie überall guten Kontakt zu der Kühlplatte hatte. Leider waren die Folien sehr empfindlich und zerbrachen leicht in trockenem Zustand. In späteren fortführenden Versuchen (47) bewährten sich Celluloseacetatfolien in Gelform ("Cellogel" Chemetron, Mailand).

Wir trugen mit einer Pipettenspitze 5 - 10 µl Hämolysat auf eine Startlinie von 2 - 2, 5 cm Länge auf. Diese Mengen reichten immer für einen deutlichen Nachweis der PK. Anfangs legten wir die Startstelle in 10 - 12 cm Abstand vom kathodischen Ende der 31, 5 cm langen und 3, 8 cm breiten Acetatfolien. Hierbei kam es aber zu einer starken Elektroosmose (10), die auch im alkalischen Puffermilieu eine Wanderung der PK kathodenwärts bewirkte. Erst als wir die Startstelle in die Mitte der Folie legten, wurden diese Störungen zum Teil ausgeglichen, so daß die PK, wenn auch nur sehr langsam in Richtung Anode lief. Wir machten Versuche mit Puffern, deren pH sich von 4, 9 bis 9, 0 und deren Ionenstärke sich von 0, 03 bis 0, 1 erstreckt. Eine Übersicht dieser Puffer ist in Tabelle 1 gegeben.

Bei den alkalischen Puffern machten wir Versuche mit Hämolysaten normaler und pathologischer Erythrozyten und gelöstem Ammoniumsulfat-Niederschlag von Normalhämolysaten. Bei den saueren Puffern wurden in erster Linie Hämolysate und nur einige wenige Proben gelösten Ammoniumsulfat-Niederschlags aufgetragen. Nach den ersten Versuchen über die günstigste Pufferart, verwandten wir schließlich nur noch sauere Pufferlösungen geringer Ionenstärken, da hier die elektroosmotischen Erschei-

Pufferart	pH	Ionen-stärke	Pufferart	pH	Ionen-stärke
Phosphat KH_2PO_4/Na_2HPO_4	4, 9	0, 05	Phosphat KH_2PO_4/Na_2HPO_4	7, 6	0, 05
	5, 0	0, 05		7, 6	0, 10
	5, 5	0, 03		8, 2	0, 05
	5, 5	0, 05		8, 2	0, 10
	5, 8	0, 05	$HBO_3/Na_2B_4O_7$	8, 9	0, 5 molar
	6, 0	0, 05	Veronal-Na/HCl	8, 5	0, 05
	6, 0	0, 10		8, 5	0, 10
	6, 45	0, 10		8, 8	0, 03
	7, 0	0, 10		9, 0	0, 04

Tab. 1

nungen (10), die sich in alkalischem Milieu durch Wanderung der PK in Richtung Kathode störend bemerkbar machten, fast fortfielen und die Trennung der PK in saueren Puffern sogar unterstützten. Mit der Ionenstärke auf Werte unter 0, 05 herunter zu gehen, brachte keine besseren Ergebnisse, da dann in saueren Pufferlösungen die Geschwindigkeit der Wanderung so vergrößert wurde, daß das Enzym leicht zerfloß, während im alkalischen Milieu eine Erniedrigung der Ionenstärke keine Verbesserung der Laufgeschwindigkeit der PK brachte.

Was Spannung und Dauer der Elektrophorese anbelangt, richteten wir uns im wesentlichen nach den Angaben von Wieland und Pfleiderer (62) sowie Pfleiderer und Wachsmuth (38, 39). Wir verwandten Spannungen zwischen 1000 und 2000 Volt/Folie, hatten also ein Spannungsgefälle von 35 - 65 V/cm. Wir wählten dabei für Puffer-Ionenstärken von 0, 1 eine Spannung von 1250 - 1500 Volt und für Ionenstärken von 0, 05 eine Spannung von 1500 - 1750 Volt. Bei höheren Spannungen bestand trotz der Kühlung die Gefahr, daß die Folie austrocknete und durchbrannte. Die Temperatur der Kühlflüssigkeit lag während der ganzen Elektrophoresedauer zwischen -3

und -5° C; die Stromstärke war nie größer als 7 mA je Folie, stieg aber bei gleichbleibender Spannung im Laufe der Elektrophorese um bis zu 1,5 mA an, was sich auch nicht durch eine noch stärkere Kühlung verhindern ließ.

Die Laufzeit der Elektrophoresen betrug zwischen 60 und 120 Minuten. Im alkalischen Milieu reichten auch längere Laufzeiten als 120 Minuten nicht zu einer besseren Trennung aus, während bei saueren Puffern 90 Minuten zu einer guten Auftrennung vollauf genügten. Dabei zeigten die Acetatfolien im Laufe unserer Untersuchungen eine leichte Veränderung in ihrer Qualität: Bei später gelieferten Folien genügten in saueren Puffern schon Zeiten von 75 Minuten zu einer guten Trennung, für die zuvor eine Laufzeit von 90 Minuten erforderlich gewesen war, obwohl alle Bedingungen konstant gehalten worden waren. Als optimale Bedingungen für vergleichende hochspannungselektrophoretische Untersuchungen der PK stellten sich folgende Bedingungen heraus:

Puffer: KH_2PO_4/Na_2HPO_4-Puffer pH 5,5; I = 0,05.
Startstelle: in der Mitte der Acetatfolie.
Aufgetragene Menge 5 - 10 µl Hämolysat, entsprechend 0,0125 - 0,0250 U an PK-Aktivität.
Dauer 75 (-90) min.; Gesamtspannung 1500 Volt = 50 Volt/cm Folie.
Temperatur: -3 bis -5° C. Stromstärke: 5 - 6 mAmpère.

III. ERGEBNISSE

1. Elektrophorese gelösten Ammoniumsulfat-Niederschlags

5 - 10 µl des gelösten Niederschlags von Hämolysaten von Normalpersonen wurden in der Mitte der Folie aufgetragen und ergaben folgende Ergebnisse: Bei Verwendung 0, 5 molaren Borsäure/Borax-Puffers von pH 8, 9 und einer Laufzeit von 90 Minuten bei 1250 Volt wurde in 15 Versuchen die PK in zwei aktive Enzymbanden aufgeteilt, wobei ein schmaler, etwa 1 cm breiter Streifen der PK an der Startstelle liegen blieb, während die gewanderte Bande 1, 5 - 2, 5 cm breit war und mit der Vorderfront 4, 0 - 4, 5 cm in Richtung Anode gelaufen war. Versuche mit anderen alkalischen Puffern Borsäure/Borax pH 8, 75, 0, 5 und 0, 3 molar) ergaben keine solch schöne Trennungen. Wohl aber trennte sich die PK in ähnlich schöner Weise wie auf der Abbildung 1, die die Elektrophorese Nr 122A zeigt, in Veronal-Puffern von pH 9, 0 mit I = 0, 04 und pH 8, 5 mit I = 0, 03. Versuche mit Phosphat-Puffern von pH 7, 6 und der Ionenstärke I = 0, 05 bzw. 0, 10 ergaben ebensowenig eine Trennung wie entsprechende Versuche mit Phosphat-Puffern von pH 7, 0 (I = 0, 1) und pH 6, 0 (I = 0, 05). Die PK blieb an der Startstelle liegen und wanderte mit ihrer Vorderfront 1 - 2 cm in Richtung Anode, während der Hämoglobinrest je nach dem pH-Wert 20 - 50 mm in Richtung Kathode gewandert war. Wir erhielten also nur in stärker alkalischen Puffern eine Auftrennung der PK in zwei aktive Enzymbanden. Die Ergebnisse der Elektrophoreseversuche mit gelöstem Ammoniumsulfat-Niederschlag von Normal-Hämolysaten sind schematisch in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Pufferart	Ionen-stärke	pH	aufgetrag. Menge gelöst. $(NH_4)_2SO_4$-Niederschlags	Spannung u. Dauer	Schematische Darstellung der Ergebnisse
Borsäure/ Borax	0,5 mol.	8,9	$7,0 \times 10^{-6}$ l	1200 V 90'	
Veronal-Na/HCl	I 0,04	9,0	$8,0 \times 10^{-6}$ l	1500 V 90'	
	I 0,05	8,5	$7,5 \times 10^{-6}$ l	1500 V 90'	
Phosphat KH_2PO_4/ Na_2HPO_4	I 0,05	7,6	$7,0 \times 10^{-6}$ l	1750 V 65'	
	I 0,10	7,6	$8,0 \times 10^{-6}$ l	1500 V 75'	
	I 0,10	7,0	$6,5 \times 10^{-6}$ l	1000 V 60'	
	I 0,05	6,0	$7,5 \times 10^{-6}$ l	1500 V 90'	
	I 0,05	5,5	$5,0 \times 10^{-6}$ l	1750 V 75'	

Tab. 2: Daten einiger typischer Elektrophoresen von gelöstem Ammoniumsulfat-Niederschlag von Normal-Hämolysaten und schematische Darstellung der Ergebnisse: Senkrechter Strich = Startlinie, Hämoglobin: ▒▒▒ Pyruvatkinase: ||||||

2. Hochspannungselektrophorese der Pyruvatkinase in Hämolysaten von Normalpersonen

Mit den oben angegebenen Pufferlösungen wurden mehr als 250 Elektrophoresen von Hämolysaten von Normalpersonen gemacht. Verschiedene Versuchsanordnungen mit alkalischen Puffern mit einem pH, der höher als 8,2 war, brachten alle keine Auftrennung der PK: Die PK lief nur sehr langsam mit der Vorderfront anodenwärts, während die Hinterfront an der Startlinie liegen blieb. Die Wanderung war daher so minimal, daß eine Auftrennung der PK in zwei Banden nicht erfolgen konnte. Als Beispiel für den nur geringen Lauf der PK sei ein Photo der Elektrophorese Nr. 272A, Abbildung 2, angeführt, bei der wir einen Veronalpuffer von pH 9,0 und der Ionenstärke 0,04 verwandten. Versuche mit anderen Veronal-Puffern von pH 8,8, I = 0,03 und pH 8,5, I = 0,05 und mit Borsäure/Borax-Puffern von pH 9,0 brachten ähnliche Ergebnisse.

Verschiedene Versuche mit Phosphat-Puffern mit abnehmenden pH-Wert und verschiedenen Ionenstärken brachten folgende Ergebnisse: Phosphat-Puffer pH 8,2, Ionenstärke 0,1: Das Hämoglobin wanderte nur schwach in Richtung Anode, während die PK praktisch an der Startlinie liegen blieb und größtenteils vom Hämoglobin überdeckt wurde. Die Bedeutung der Ionenstärke für den Lauf einer Elektrophorese zeigen Versuche beim gleichen pH aber einer Ionenstärke von 0,05: Die PK zeigte noch eine schwache Wanderung in Richtung Anode, während das Hämoglobin bereits kathodenwärts gelaufen war. Nahezu ein gleichartiges Ergebnis zeigten Elektrophoresen mit Phosphat-Puffer pH 7,6 und der Ionenstärke 0,1; das Hämoglobin lief lediglich etwas weniger weit in Richtung Kathode. Beim gleichen Phosphat-Puffer, der aber eine Ionenstärke von 0,05 hatte, erhielten wir in 10 Versuchen eine Auftrennung der PK in 2 aktive Enzymbanden. Die Wanderung war zwar nicht so regelmäßig wie bei niederen pH-Werten, reichte aber dennoch für eine eindeutige Auftrennung der PK völlig aus. Das Hämoglobin war wesentlich weiter gelaufen, stellte sich aber auch als ein wesentlich breiterer Streifen als bei der Ionenstärke 0,1 dar. Eine Gegenüberstellung der Abbildungen 3 und 4, die sich lediglich in der Ionen-

stärke unterscheiden, zeigt deutlich deren Einfluß auf die Auftrennung der PK in 2 Enzymbanden.

Bereits zu Anfang unserer Untersuchungen durchgeführte Versuche mit Phosphat-Puffern von pH 7, 0 und 6, 45 mit der Ionenstärke 0, 10 ergaben keine Auftrennung der PK in zwei Fraktionen, der Lauf selbst des Hämoglobins war sogar geringer als bei pH 7, 6 und der Ionenstärke von ebenfalls 0, 10. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß diese Folien noch etwas andere Eigenschaften hatten als die aus den neueren Lieferungen stammenden Folien. Hierfür dürfte auch eine erhebliche Zunahme der Laufgeschwindigkeit von Hämoglobin und PK sprechen, die bei neueren Sendungen mit Acetatfolien eintrat. Dabei handelte es sich um Versuche mit Phosphat-Puffern von pH 5, 5 und der Ionenstärke 0, 05: Obwohl alle Versuchsbedingungen konstant gehalten wurden, reichten bei Folien aus diesen neueren Lieferungen schon 75 anstatt 90 Minuten zu einer guten Trennung aus. Wir benutzten in der Folgezeit nur diese Folien.

Bei der Ionenstärke 0, 10 reichte auch ein pH von 6, 0 nicht zu einer Auftrennung der PK in 2 Banden aus. Setzten wir nun die Ionenstärke auf 0, 05 herunter, so bekamen wir bereits recht gute Trennungen, wie 12 Versuche dieser Art zeigten. Die Abbildung 5 zeigt, daß das Hämoglobin schon 21 cm kathodenwärts gewandert ist. Die PK hat sich deutlich in 2 Banden aufgeteilt, von denen eine an der Startlinie liegen geblieben ist, während die andere kathodenwärts gewandert ist. Die abgebildete Elektrophorese lief zwar nur bei 1000 Volt Spannung, Versuche mit 1500 Volt ergaben aber gleiche Ergebnisse. Bei 2000 Volt war die gewanderte Bande nur noch schlecht nachzuweisen, da die PK bei dieser hohen Spannung offensichtlich schon stark gelitten hatte. Bei diesem Versuch hatte sich aber die vordere, gewanderte PK-Bande noch einmal in zwei Unterbanden aufgeteilt darstellen lassen. Auch bei einigen Versuchen mit Puffern bei pH 5, 5 ließen sich 3 Banden darstellen.

Auch bei Phosphat-Puffer von pH 5, 8 mit der Ionenstärke 0, 05 trennte sich die PK sehr gut in zwei Banden, wenn wir wenigstens 5 µl Hämolysat auf die Startlinie von 2, 5 cm Länge auftrugen. Als optimal stellten sich Elektro-

phoresen mit Phosphat-Puffer von pH 5, 5 und der Ionenstärke 0, 05 heraus: in 90 (bei den neueren Folien in 75) Minuten kam es immer zu einer ausgezeichneten Auftrennung der PK in 2 Fraktionen. Die Laufgeschwindigkeit war gut, und eine weitere Herabsetzung der Ionenstärke auf 0, 03 brachte keine Verbesserung der Trennung mehr, sondern ließ die gewanderte PK-Bande nur noch sehr schwach erkennen. Bei pH 5, 0 und der Ionenstärke 0, 05 war die gewanderte PK-Bande praktisch nicht mehr festzustellen, wahrscheinlich weil die Hemmwirkung des schon recht niedrigen pH-Wertes sich bei dieser schwächeren Bande stärker bemerkbar macht oder weil das Enzymprotein dieser Bande auf eine Verschiebung des pH-Wertes zum saueren hin empfindlicher reagiert als die Startbande. Eine Trennung der PK bei pH 5, 5 und der Ionenstärke 0, 05 sah meist wie Abbildung 6 aus, die zur Beschreibung der typischen Merkmale der PK der Normalerythrozyten dienen soll.

Wir sehen deutlich, daß die Pyruvatkinase in 2 Enzymbanden aufgetrennt worden ist. Die langsamere Bande blieb mit ihrer Hinterfront an der Startlinie liegen, während die Vorderfront 3 - 4 cm kathodenwärts gewandert war. Wir bezeichneten die langsame Bande mit I und die gewanderte mit II. Bande II erscheint meist schmaler (1, 5 - 2, 5 cm) als Bande I und lief mit ihrer Vorderfront (bei 75 bzw. 90 minütiger Dauer) 70 - 90 mm kathodenwärts. Das Hämoglobin lief in dieser Zeit bis zum kathodalen Ende der Acetatfolie und ist daher auf den Photos der meisten Elektrophoresen nicht mehr zu sehen.

Die geringste Hämolysatmenge, die wir auftrugen und die noch eine gute Trennung der PK in 2 Banden zeigte, betrug 3, 5 µl/3 cm Startlinie. Auch wenn mehr als 10 µl Hämolysat aufgetragen wurden, bis maximal 15 - 20 µl/3 cm Startlinie, erhielten wir eine deutliche Trennung der PK in 2 Enzymfraktionen. Mehr als 135 Elektrophoresen von Normalhämolysaten brachten solche Ergebnisse. Die schematische Darstellung der verschiedenen Elektrophoresen von Normalhämolysaten findet sich in Tabelle 3.

Pufferart	Ionenstärke	pH	aufgetrag. Hämolysatmenge	Spannung u. Dauer in min.	Schematische Darstellung der Elektrophorese-Ergebnisse
Veronal-Na/HCl	I 0,04	9,0	$8,5 \times 10^{-6}$ l	1500 V 90'	
	I 0,03	8,8	$7,0 \times 10^{-6}$ l	1500 V 90'	
	I 0,05	8,5	$7,5 \times 10^{-6}$ l	1750 V 90'	
	I 0,10	8,5	$6,0 \times 10^{-6}$ l	1250 V 90'	
Borsäure/ Borax	0,5 mol.	8,9	$7,0 \times 10^{-6}$ l	1250 V 90'	
Phosphat KH_2PO_4/ Na_2HPO_4	I 0,10	8,2	$7,0 \times 10^{-6}$ l	1500 V 90'	
	I 0,05	8,2	$6,0 \times 10^{-6}$ l	1500 V 100'	
	I 0,10	7,6	$8,0 \times 10^{-6}$ l	1250 V 75'	
	I 0,10	6,45	$5,5 \times 10^{-6}$ l	1250 V 105'	
	I 0,10	6,0	$7,5 \times 10^{-6}$ l	1250 V 120'	
	I 0,05	7,6	$8,0 \times 10^{-6}$ l	1500 V 90'	
	I 0,05	6,0	$5,0 \times 10^{-6}$ l	1000 V 100'	
	I 0,05	5,8	$5,5 \times 10^{-6}$ l	1250 V 90'	
	I 0,05	5,5	$7,0 \times 10^{-6}$ l	1500 V 75'	
	I 0,03	5,5	$9,5 \times 10^{-6}$ l	1500 V 60'	
	I 0,05	5,0	$9,0 \times 10^{-6}$ l	1500 V 70'	

Tab. 3: Daten einiger typischer PK-Elektrophoresen von Normalerythrozyten und schematische Darstellung der Ergebnisse: Der senkrechte Strich entspricht der Startlinie. Hämoglobin: ▓ Pyruvatkinase: ≡

	Name	aufgetragene Gesamtaktivität an PK	eluierte Gesamtaktivität an PK	eluiert an Bande I	eluiert an Bande II	Prozent der eluierten Gesamtaktivität auf Bande I	Bande II
E 321	Knod.		0,002630 U	0,001426 U	0,001204 U	54,5%	45,5%
E 324	Scha.		0,002840 U	0,001550 U	0,001290 U	55,0%	45,0%
E 359 A	Hell.	0,0198 U	0,003490 U	0,002150 U	0,001340 U	61,7%	38,3%
E 371 B	Her.	0,0197 U	0,003434 U	0,001864 U	0,001570 U	54,5%	45,5%
E 374	Knüf.	0,0135 U	0,003284 U	0,001785 U	0,001459 U	54,5%	45,5%
E 376	Meie.	0,0173 U	0,003900 U	0,002250 U	0,001650 U	57,7%	42,3%
E 381 A	Gerb.		0,003575 U	0,002010 U	0,001565 U	56,3%	43,7%
E 382	Schö.	0,0125 U	0,003238 U	0,001665 U	0,001573 U	51,5%	48,5%
E 385 B	Skib.	0,0214 U	0,004000 U	0,001950 U	0,002050 U	48,8%	51,2%
E 385 A	Murr.	0,0232 U	0,003793 U	0,002058 U	0,001735 U	54,2%	45,8%
E 387 B	Hauß.	0,0188 U	0,004690 U	0,002740 U	0,001950 U	58,5%	41,5%
E 387 A	Eug.	0,0310 U	0,007130 U	0,003870 U	0,003260 U	54,3%	45,7%
E 388 A	Henn.	0,0136 U	0,003430 U	0,001810 U	0,001620 U	52,9%	47,1%
E 389 B	Andr.	0,0156 U	0,00450 U	0,002320 U	0,002185 U	51,5%	48,5%
E 353	Roth.		0,005050 U	0,003030 U	0,002020 U	60,0%	40,0%
E 386 B	Früh.	0,0246 U	0,004708 U	0,002705 U	0,002004 U	57,5%	42,5%

Tab. 4: Aktivitätsbestimmungen der einzelnen Pyruvatkinase-Banden bei 16 Normalpersonen nach Elution mit Triäthanolamin-HCl-Puffer (0,05 molar, pH 7,5) aus der Acetatfolie

3. Bestimmung der Pyruvatkinase-Aktivitäten nach der Elution der Pyruvatkinase-Banden aus den Acetatfolien

Die Aktivitäten der einzelnen Banden wurden nach der Elution mit dem optischen Test im Eppendorf-Photometer bestimmt und in Tabelle 4 zusammengefaßt. Im allgemeinen wurden nur etwa 20% der ursprünglich aufgetragenen Aktivität wieder gefunden. Die PK verteilte sich dabei zu 55,2% auf die Bande I (Startbande) und zu 44,8% auf die gewanderte Bande II. Die auf die Folie aufgetragene Hämolysatmenge spielt offensichtlich keine große Rolle, da eine Verdoppelung der aufgetragenen Hämolysatmenge keine anderen Ergebnisse bringt, wie es ein Vergleich der eluierten Aktivität von E 321 (Knod.) und E 353 (Roth.), siehe Tabelle 4, sehr schön zeigt.

4. Hochspannungselektrophorese von Hämolysaten von Personen mit Pyruvatkinase-Mangel

Ende Februar 1966 kamen Blutproben einer fünfköpfigen Familie mit Pyruvatkinase-Mangel der Erythrozyten zur Untersuchung.[+)] Ein Familienmitglied, Günther W., ist homozygoter, die anderen vier Familienmitglieder sind heterozygote Defektträger. Die pH-Optima, soweit gemessen, und die PK-Aktivität der einzelnen Familienmitglieder sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Abbildung 7 zeigt die pH-Abhängigkeit der PK, wie sie von Blume et al. (5) festgestellt wurde.

Bei allen Familienmitgliedern machten wir Versuche mit Phosphat-Puffer von pH 5,5 und der Ionenstärke 0,05. Dabei erzielten wir folgende Ergebnisse:

[+)] An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. H.D. Waller sehr herzlich für die Vermittlung der Blutproben und Überlassung der pH-Optima der PK danken.

	pH-Optimum	PK-Aktivität in $U/10^{11}$ Erythrozyten
Normalpersonen	6,9	41,7 ± 6,3
Gerhard W., Vater heterozygot	7,3	33,4
Marion W., Mutter heterozygot		27,2
Horst W., Bruder heterozygot		23,8
Krista S., Schwester heterozygot		25,3
Günther W. homozygot	7,35	13,4

Tab. 5

Heterozygote Defektträger:

a.) Gerhard W., Vater, zeigte einen leichten PK-Mangel von 33,4 $U/10^{11}$ Erythrozyten. Eine Elektrophorese seiner PK zeigte die Abbildung 8. Wir trugen eine sehr große Hämolysatmenge auf, da ja die Aktivität der PK niedriger war als normal, und sahen, daß die Bande I wie gewohnt an der Startlinie liegen geblieben war. Bande II war gut kathodenwärts gewandert und erschien wesentlich breiter als Bande I. Dies stellt einen Unterschied zu den Elektrophoreseergebnissen der Normal-PK dar, da bei dieser die Bande II nie breiter, meistens viel schmaler bis höchstens gleich breit, erschien. Die Bande II wanderte ebenso schnell und weit wie bei den Normalfällen.

Elutionsversuche mit 0,4 molarem Phosphat-Puffer von pH 7,5 ergaben eine Aktivitätsverteilung von 35,2% auf Bande I und 64,8% auf Bande II. Spätere Wiederholungen dieser Versuche, aber diesmal mit Triäthanolamin-HCl-Puffer (pH 7,5; I = 0,05), ergaben eine ähnliche Verteilung der PK-Aktivität: 29,5% auf Bande I und 70,5% auf Bande II. Der Aktivitätsverlust der Erythrozyten-PK ist also auf eine mangelnde Aktivität der Bande I zurück-

zuführen. Dadurch kommt es zu einem relativen Anstieg der normal vorhandenen Bande II an der Gesamt-PK-Aktivität.

b.) Horst W., heterozygoter Bruder von Günther W., zeigte eine Verminderung der PK auf 23,8 U/10^{11} Erythrozyten. Wie die Abbildung 9 zeigt, weist die Elektrophorese seines Hämolysats keine Besonderheiten auf: Bande I blieb an der Startlinie liegen, während Bande II eine normale Wanderung zeigte und etwas schmaler als Bande I erscheint. Das Hämoglobin ist auf dieser Aufnahme nicht mehr zu sehen, da es bereits außerhalb des von UV-Licht beleuchteten Teils der Folie liegt.

Die Elutionsversuche zeigten aber ebenso wie bei Gerhard W., dem heterozygoten Vater, eine deutlich abgeschwächte Bande I und damit ein relatives Ansteigen der Bande II. Die Gesamtaktivität verteilt sich zu 42,5% (normal: 55,2%) auf Bande I und zu 57,5% (44,8%) auf Bande II.

c.) Marion W. und Krista S.. Wie die Abbildung 10 zeigt, war die Elektrophorese der PK der heterozygoten Mutter Marion (Ende Januar 1966 hatte die PK eine Aktivität von 27,7 und Ende Februar 1966 von 38 U/10^{11} Erythrozyten, also einen praktisch normalen PK-Wert) ohne Besonderheiten. Daß die beiden Banden besonders breit erscheinen, liegt an der sehr großen aufgetragenen Hämolysatmenge. Elutionsversuche und Bestimmungen der Aktivitätsverteilung ergaben, entsprechend dem hohen PK-Gehalt von 38 U/10^{11} Erythrozyten Ende Februar 1966, keine großen Abweichungen von der Norm. Bande I liegt mit 47,75% kaum unter dem 2σ-Wert, Bande II ist nur mäßig auf 52,25% angestiegen. Im Januar, als die PK-Aktivität nur 27,2 U/10^{11} betragen hatte, war das Verhältnis der Banden deutlich zugunsten von II verändert: Bande I 30,7%, Bande II 69,3%. Elektrophoresen von Blutproben der heterozygoten Schwester von Günther W., Krista S., ergaben ähnliche Ergebnisse wie Marion W.

d.) Homozygoter Defektträger. Günther W. ist ein homozygoter Defektträger mit einer seit längerer Zeit bekannten klinisch manifesten PK-Mangel-Anämie. Seine Erythrozyten zeigten Ende Februar 1966 eine Aktivität von 13,4 U/10^{11} Erythrozyten. Die Hämolysate im Januar zeigten einen so

schnellen Aktivitätsabfall, daß nur von ganz frischen Hämolysaten Elektrophoresen gemacht wurden. Wir erhielten dabei Ergebnisse, die sich in starkem Maße von denen der Normalpersonen und auch der heterozygoten Defektträger unterschieden. Während bei den heterozygoten Defektträgern die Bande nur mäßig verschmälert war, konnten wir bei Günther praktisch keine Bande I feststellen: An der Startlinie war die PK nur als sehr schwache, schleierartige Trübung zu erkennen, wenn wir mindestens 10 µl auftrugen, Mengen also, die auch bei den heterozygoten Defektträgern eine sehr gute Darstellung von I als breite Bande ermöglichten. Wir starteten noch 11 weitere Elektrophoresen der gleichen Blutprobe und trugen dabei zwischen 10 und 40 µl Hämolysat auf die Folie auf. Auch bei diesen sehr großen Hämolysatmengen ließ sich die Bande I kaum nachweisen und erschien höchstens als ganz schmaler Streifen an der Startlinie. Bande II dagegen war in allen Untersuchungen normal breit, und auch die zurückgelegte Strecke wich nicht von der Norm ab. Leider mißlangen ausgerechnet die Photos dieser Versuche, so daß wir ein Photo einer Elektrophorese mit neuem, etwas aktiveren Hämolysat von Ende Februar zeigen (Abbildung 11).

Die Bande I ist diesmal zwar vorhanden, aber doch nur von sehr geringer Ausprägung, teilweise erkennt man nur eine schwarzwolkige Trübung. Im oberen Teil der Folie ist sie zwar schmal, aber doch deutlich als 0,8 cm breiter Streifen zu erkennen. Die Bande I der PK ist sogar etwa 0,6 cm von der Startlinie fortgewandert. Das läßt vielleicht weniger an einen Mangel an normalem Enzymprotein als ein in der Struktur verändertes Protein, also an eine qualitative Störung der PK-Synthese denken, denn die Bande I der normalen PK wanderte auch dann nicht von der Startlinie kathodenwärts fort, wenn wir sehr geringe Enzymmengen auftrugen. Außer der hier abgebildeten und den für die Elutions-Versuche erforderlichen Elektrophoresen machten wir noch weitere 5 Elektrophoresen dieser Blutprobe. Wir steigerten die auf die Folie aufgetragene Hämolysatmenge bis auf 30 µl und erhielten dennoch eine im Vergleich zu Bande II nur sehr schmale Bande I der PK, die in 2 Versuchen sogar bis 20 mm kathodenwärts gelaufen war.

Nach dem Nachweis eluierten wir sowohl im Januar wie Februar die PK-Banden und fanden dabei etwa 30% der ursprünglich aufgetragenen Aktivität

wieder. Diese verteilte sich zu 74 bzw. 70% auf Bande II und zu 26 bzw. 30% auf Bande I. Die auf der Folie so ausgeprägte Verminderung der Bande I zeigte sich also auch bei der Aktivitätsbestimmung der PK im Photometer.

Die Elutionsergebnisse der PK-Mangel-Familie W. wurden in Tabelle 6 zusammengefaßt. Es zeigt sich deutlich, daß sich der PK-Mangel in einer Verminderung der Bande I äußert, während Bande II ein normales hochspannungselektrophoretisches Verhalten zeigt. Bei Günther W., dem homozygoten Defektträger, zeigt die Bande I eine wesentlich bessere Wanderung als normal, fehlt dabei aber fast vollkommen. Durch die starke Verminderung der Bande I kommt es zu einem deutlichen relativen Anstieg der Bande II an der Gesamtaktivität: Bei Günther, Horst, Gerhard und Marion W. nimmt die Bande I von 55% auf 42 - 25% ab, und Bande II nimmt von 45% auf 57 - 70% zu.

	Aktivität/10^{11} Erys.	Aktivität/1 ml Hämolys.	aufgetragen auf die Folie	eluiert insgesamt	Prozent der eluierten Gesamtaktivität an PK Bande I	Bande II
	Elution mit Phosphatpuffer pH 7,5; 0,4 molar. Januar 1966					
Gerhard W., Vater heterozygot	33,4 U^{++}	0,825 U	0,0254 U	0,003865 U	35,2%	64,8%
Horst W., Bruder heterozygot	23,8 U	0,760 U	0,0228 U	0,002025 U	42,5%	57,5%
Marion W., Mutter heterozygot	27,2 U	0,494 U	0,0224 U	0,002528 U	30,7%	69,3%
	Elution mit TRAP pH 7,5; 0,05 molar. Februar 1966					
Marion W., Mutter heterozygot	38,0 U^{++}	0,694 U	0,0173 U	0,004690 U	47,7%	52,3%
Günther W. homozygot	13,4 U	0,278 U	0,0103 U	0,005200 U	30,0%	70,2%
Günther W. homozygot	13,4 U	0,278 U	0,0088 U	0,005590 U	25,8%	74,2%
Gerhard W., Vater heterozygot	37,2 U^{++}	0,740 U	0,0226 U	0,00900 U	29,5%	70,5%

Tab. 6: Hochspannungs-Elektrophorese der Erythrocyten-Pyruvatkinase von Patienten mit Pyruvatkinase-Mangel. Aktivitätsbestimmung der Isozyme der PK nach der Elution aus den Membranfolien

$^{++}$ Obwohl Marion W. und Gerhard W. seit längerem als eindeutig heterozygot bekannt sind, lagen die im Februar 1966 bestimmten PK-Aktivitäten ausgeprochen hoch.

IV. DISKUSSION

Unter den in Teil II beschriebenen Versuchsbedingungen ergab die Hochspannungselektrophorese der Erythrocyten-PK eine Auftrennung in 2 aktive Enzymbanden. Diese Ergebnisse stehen in Gegensatz zu Versuchen von Koler und Mitarbeitern (21), die etwa zur gleichen Zeit (1964) Elektrophorese-Versuche der Erythrozyten, allerdings auf Stärkegel, machten. Zwar fanden diese Autoren nach der Elution der PK aus der Stärke deutliche Unterschiede zwischen Erythrozyten- und Leukozyten-PK, eine Trennung der Erythrozyten-PK in mehrere aktive Enzymbanden gelang ihnen jedoch nicht. Die Ursache hierzu mag möglicherweise in der Alkalität des Puffers liegen, denn auch bei unseren Versuchen konnten wir bei stärker alkalischen Puffern keine Auftrennung der PK erzielten. Hinzu kommt, daß bei großen Ionenstärken die Lauf- und damit auch die Auftrennungsgeschwindigkeit stark herabgesetzt wird, wie eigene Versuche mit Phosphat-Puffern verschiedener Ionenstärken zeigten. Die Tatsache, daß Eluate aus Chromatographie-Versuchen verwandt wurden (Inaktivierung? Unvollständige Lösung von den Trägermedien?), mag ebenso die Ursache der Nicht-Auftrennung sein wie die lange Elektrophorese-Dauer von 21 Stunden.

1967 wurden unsere Versuche in vollem Umfang von Townes (52) bestätigt, der Erythrozyten-PK auf Stärkegel sowohl bei saueren (pH 5, 0) wie auch alkalischen (pH 8, 6) Puffern geringer Molarität in 2 aktive Enzymbanden auftrennen konnten. Dabei fand Townes ebenso wie wir eine schnell wandernde Fraktion, die in die gleiche Richtung wie das Hämoglobin, d.h. in sauerem Puffer-Milieu kathodenwärts und in alkalischen Puffern anodenwärts lief. Eine langsame Komponente blieb praktisch an der Startlinie liegen. Starke elektroosmotische Störungen, die sich auf der Acetatfolie gerade bei alkalischen Puffern stark bemerkbar machten, dürften die Ursache dafür sein, daß sich die PK des eiweißreichen Rohhämolysats in unseren Versuchen in alkalischen Puffern nicht und nur der in bidest gelöste Ammoniumsulfat-Nieder-

schlag in 2 aktive Enzymbanden trennen ließ.

Die sowohl im saueren wie alkalischen schnell wandernde Fraktion bezeichnete Townes als "F", sie entspricht unserer Bande II, während die nur gering gelaufene Bande "S" unserer I entspricht. Die Enteilung in eine schnelle und eine langsame ("F" und "S") Bande erscheint uns jetzt günstiger, da sie vom pH unsabhängig die Banden eindeutig charakterisiert.

Townes konnte auch die Leukozyten-PK in 2 Banden auftrennen, wobei er eine mittelschnelle (intermediate "I") und wiederum eine langsame ("S") Bande fand. Wahrscheinlich handelt es sich also bei unseren Versuchen, die eine nochmalige Unterteilung der Bande II ergeben hatten, um eine Verunreinigung durch Leukozyten-PK bei schlechter Abtrennung der Leukozyten aus besonders leukozytenreichem Blut. Die mittlere unserer in diesen Versuchen 3 Banden dürfte also der Leukozyten-Bande "I" von Townes entsprechen.

In Fortführung der mit dieser Arbeit begonnenen Untersuchungen trennten später Rüdiger et al. (47) die Leukozyten vor der Hämolyse nach einem Verfahren von Busch (8) durch Filtration über Baumwolle ab. Bei leichter Modifikation der Testbedingungen, insbesondere Verwendung einer Celluloseacetatfolie in Gelform ("Cellogel" Chemetron, Mailand), konnten sie ebenfalls eine Trennung der PK in 2 Banden erreichen (4, 47). Bei diesen Versuchen ist die Bande I allerdings etwas anodenwärts gelaufen. Da bei diesen leukozytenfreien Hämolysaten nie eine 3. Bande gefunden wurde, dürfte es sich in der Tat bei der oben beschriebenen mittelschnellen Bande unserer Versuche um Leukozyten-PK gehandelt haben.

Überraschenderweise konnte Townes bei der Untersuchung von Hämolysaten mit PK-Mangel weder Bande I noch II nachweisen. Dieses Ergebnis steht in deutlichem Gegensatz zu unseren Versuchen, bei denen sich ja die Bande II (F) ganz hervorragend nachweisen ließ, während Bande I (S) zwar sehr stark abgeschwächt aber noch eindeutig nachweisbar ist. Die Erklärung für diese Unterschiede könnte in einer anderen Zusammensetzung der Testlösung liegen, da Löhr und Waller (28, 56) früher schon nach Substratoptimierung auch bei PK-Mangel recht hohen Aktivitäten messen konnten. So kann in unseren

Untersuchungen der hohe PEP-Gehalt der Testlösung ($9 \cdot 10^{-5}$ Mol/20 ml) den Nachweis ermöglicht haben. Diese Ergebnisse sprechen ebenso wie die Veränderung des pH-Optimums bei PK-Mangel mehr für eine qualitative als eine quantitative Änderung am Enzymprotein, einen Defekt also, der durch Variation der Versuchsbedingungen u.U. ausgeglichen werden kann. Wie das Enzym in seiner Struktur verändert ist, ist noch nicht geklärt, lediglich eine Veränderung der Primärstruktur scheint sehr unwahrscheinlich zu sein (3).

Ob der Bande I und II je ein eigenes Gen vorgeordnet ist, konnte noch nicht geklärt werden. Townes nimmt an, daß ein Gen die Synthese eines Oligomeres steuert und daß die verschiedenen Enzym-Fraktionen sich dann nur in dem Aggregatzustand des Oligomeren unterscheiden. Unter dieser Annahme müßte eigentlich ein Gendefekt zu einem Abfall bzw. Ausfall beider Enzymbanden führen, was wir in unseren Versuchen nicht finden konnten. Während Blume et al. (3) bei ihrer Auftrennung der PK in 2 Banden auch über einen Fall mit starker Verminderung der Bande I berichteten, siehe Abbildung 12, die aus dieser Arbeit stammt, konnten Rüdiger, Blume et al. auch einen Defektträger entdecken bei dem nicht Bande I, sondern die gewanderte Bande II fehlt (47).

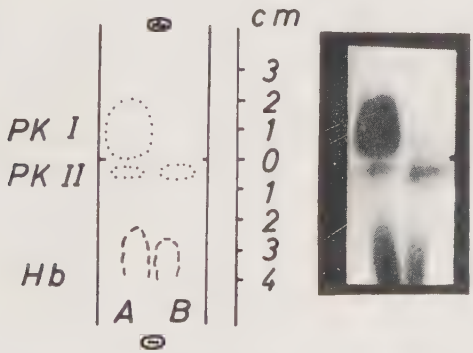

Abb. 12: Elektrophorese der PK eines homozygoten Defektträgers und einer Normalperson. Siehe auch den Text.

Auch diese Ergebnisse sprechen gegen die Auffassung von Townes. Neuere Untersuchungen von Blume et al. (3) zeigen, daß in menschlichen Erythrozyten zwei kinetisch von einander unabhängige PK-Fraktionen vorkommen, von denen die eine durch Fruktose-1, 6-diphosphat allosterisch aktiviert werden kann (E_{FP_2} +), während bei der anderen Fruktose-1, 6-diphosphat keine Aktivitätssteigerung hervorruft (E_{FP_2} -). Sie nehmen an, daß sich E_{FP_2} + und E_{FP_2} - von zwei verschiedenen genetischen Informationen herleiten und möglicherweise 2 unterschiedlichen Zelltypen zugeordnet werden können. Nach diesen Untersuchungen scheint es hypothetisch auch möglich, daß die genetische Determinierung des Pyruvatkinase-Mangels auch Ausdruck einer noch nicht bekannten und genetisch bedingten Stoffwechselanomalie der Erythrozyten, vielleicht eines primären Membrandefekts, ist, die dann eine (zu) hohe Anforderung an den Erythrozyten stellt. Weitere Untersuchungen werden später diese Frage noch klären müssen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden auf Acetatfolien in einer gekühlten Elektrophorese-Apparatur nach Wieland und Pfleiderer Versuche zur Hochspannungselektrophorese der Erythrozyten-Pyruvatkinase vom Menschen durchgeführt. Im ersten Teil der Arbeit wurden im wesentlichen Methoden zum Nachweis der PK, zur Dokumentation mittels UV- und Fluoreszenz-Photographie und zur Elution der PK aus der Acetatfolie entwickelt. Es wurden weiterhin die optimalen Bedingungen zur Hochspannungselektrophorese der PK beschrieben.

Im 2. Teil der Arbeit erfolgten die Versuche zur Trennung der Erythrozyten-PK. Dabei ergab sich, daß die PK in saueren Puffern von der Ionenstärke 0,05 - 0,10 in 75 - 90 Minuten bei pH 5,5 und 1500 Volt in 2 aktive Enzymbanden aufgetrennt wird. Die Aktivität der PK verteilt sich zu 55% auf die an der Startlinie liegen gebliebene Fraktion, die wir als Bande I bezeichneten, und zu 45% auf eine kathodenwärts gewanderte Bande II.

Im 3. Teil der Arbeit wurde eine Familie mit 4 heterozygoten Mitgliedern mit Pyruvatkinase-Mangel und einem homozygoten Defektträger untersucht. In allen Fällen zeigte die Bande II keine Abweichung in Aktivität und Wanderung von der Norm. Bande I war in allen Fällen vermindert. Besonders stark war der Abfall der Aktivität im Nachweis bei dem homozygoten Defektträger, bei dem Bande I fast völlig fehlte und auf der Acetatfolie kaum mehr nachzuweisen war.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Beisenher, G., H.J. Boltze, T. Bücher u.a.
..... und Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel:
Z. f. Naturf. 8b, 555 577 (1953).

2. Bergmayer, H.U.
Methoden der enzymatischen Analyse, 32 - 34,
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1962).

3. Blume, K.G., R.W. Hofbauer, G.W. Löhr und H.W. Rüdiger
Biochemische und genetische Untersuchungen zu Pyruvatkinase menschlicher Erythrozyten:
Arch. f. klin. Med., im Druck (1969).

4. Blume, K.G., G.W. Löhr, H.W. Rüdiger und A. Schalhorn
Pyruvate kinase in human erythrocytes:
Lancet 1968 I, 529 - 530.

5. Blume, K.G., G.W. Löhr, O. Praetsch, H.W. Rüdiger und G.G. Wendt
Beitrag zur Populationsgenetik der Pyruvatkinase:
Humangenetik 6, 261 - 265 (1968).

6. Boyer, P.D., H.A. Lardy, and P.H. Phillips
The role of potassium in muscle phosphorylation:
J. biol. chem. 146, 673 - 682 (1942).

7. Boyer, P.D., H.A. Lardy and P.H. Phillips
Further studies on the role of potassium and other ions in the phosphorylation of the adenylic system:
J. biol. chem. 149, 529 - 541 (1943).

8. Busch, D., und K. Pelz
Erythrozytenisolierung aus Blut mit Baumwolle:
Klin. Wschr. 44, 983 - 984 (1966).

9. Bücher, T. und G. Pfleiderer
Pyruvate kinase from muscle in
Colowick, S.P. and N.O. Kaplan
Methods in enzymology Vol. I, 435 - 440, New York (1955).

10. Clotten, R., und A. Clotten
Hochspannungselektrophorese, 10 - 11,
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1962).

11. Dacie, J.V.
The hemolytic anemias I
2. Aufl., Churchill, London (1960).

12. Dacie, J.V., P.L. Mollison, N. Richardson, J.G. Selwyn und L. Shapiro
Atypical congenital hemolytic anemias:
Quart. J. Med. 22, 79 - 98 (1953).

13. Farb- und Filterglas für Wissenschaft und Technik
Auszug aus dem Katalog Nr. 365/1959 der Firma
Jenaer Glaswerk Schott & Gen., Mainz.

14. von Fellenberg, R., R. Richterich und K. Aebi
Elektrophoretisch verschieden wandernde Pyruvatkinasen aus einigen Organen der Ratte:
Enzymol. Biol. Clin. 3, 240 - 250 (1963).

15. de Gruchy, G.C., J.N. Santamaria, J.C. Parson and H. Crawford
Nonspherocytic congenital hemolytic anemia:
Blood 16, 1371 - 1397 (1960).

16. Kachmar, J.F. and P.D. Boyer
Kinetic analysis of enzyme reactions.
II. The potassium activation and calcium inhibition of pyruvic phosphoferase:
J. biol. chem. 200, 669 - 682 (1953).

17. Keitt, A.S. and D.C. Bennet
Pyruvate kinase deficiency and related disorders of red cells glycolysis:
Am. J. Med. 41, 762 ff. (1966).

18. Kohn, J.
A new supporting medium for zone electrophoresis:
Proceedings of the Biochemical Society 9p in
Biochem. J. 65 (1957).

19. Kohn, J.
A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis:
Clin. Chim. Acta 2, 297 - 303 (1957).

20. Kornberg, A. and W.E. Pricer jr.
Enzymic phosphorylation of adenosine and 2,6-diaminopurine riboside:
J. biol. chem. 193, 481 - 495 (1951).

21. Koler, R.D., R.H. Bigley, R.T. Jones, D.A. Rigas, P. Vanbellinghen and P. Thompson
Pyruvate kinase: Molecular differences between human red cell and leukocyte enzyme:
Cold Spring Harbour Symposion on Quantitative Biology 29, 214 - 221 (1964).

22. Kubowitz, F. und P. Ott
Isolierung von Gärungsfermenten aus menschlichem Muskel:
Biochem. Z. 317, 193 - 203 (1943).

23. Lardy, H.A. and J.A. Ziegler
The enzymatic synthesis of phosphopyruvate from pyruvate:
J. biol. chem. 159, 343 - 351 (1945).

24. Lohmann, K. und O. Meyerhof
Über die enzymatische Umwandlung von Phosphoglycerinsäure in Brenztraubensäure und Phosphorsäure:
Biochem. Z. 273, 60 - 62 (1934).

25. Löhr, G.W. und H.D. Waller
Eine neue enzymopenische hämolytische Anämie mit Glutathionreduktasemangel:
Med. Klin. 57, 1521 - 1525 (1962).

26. Löhr, G.W. und H.D. Waller
Zur Biochemie einiger angeborener hämolytischer Anämien:
Folia haemat. N.F. 8, 377 - 397 (1963).

27. Löhr, G.W., in Linneweh, F.
Erbliche Stoffwechselkrankheiten, 328 - 332
Urban und Schwarzenberg, München-Berlin (1962).

28. Löhr, G.W.
Hämatologische Enzymologie:
Helvetica Medica Acta 30, 428 - 448 (1963).

29. Löhr, G.W. und H.D. Waller
Quantitative Fermentbestimmungen von roten Blutzellen:
Klin. Wschr. 35, 871 - 875 (1957).

30. Löhr, G.W. und H.D. Waller
Enzymverteilungsmuster und Energiestoffwechsel normaler und leukämischer Blutzellen des Menschen:
Dt. Med. Wschr. 89, 171 - 180 (1964).

31. London, I.M.: Harvey Lect. 58 (1961), zitiert nach 28.

32. London, I.M., D. Shemmin and D. Rittenberg
Lynthesis of heme in vitro by the immature nonnucleated mammalian erythrocyte:
J. biol. chem. 183, 749 - 755 (1950).

33. Meyerhof, O. und P. Oesper
The enzymatic equilibria of phospho(enol)pyruvate:
J. biol. chem. 179, 1371 - 1385 (1949).

34. Morawiecki, A.
Dissociation of pyruvic kinase in urea solution:
Biochim. biophys. Acta 44, 604 - 605 (1960).

35. Negelein, E.
unveröffentlicht, Manuskript durch Kriegswirren verloren gegangen.

36. Oriol-Bosch, A. und K.D. Voigt
Über die Anwendung einer Celluloseacetat-Folie für die Eiweißelektrophorese:
Klin. Wschr. 37, 758 - 761 (1959).

37. Oski, F.A., Nathan, D.G., Seidel, V.W. and Diamond, L.K.
Extreme hemolysis and red cell distortion in erythrocyte pyruvate kinase deficiency. I. Morphology, erythrokinetics and family enzyme studies:
New. Eng. J. Med. 270, 1023 - 1030 (1964).

38. Pfleiderer, G. und E.D. Wachsmuth
Alters- und funktionsabhängige Differenzierung der Laktatdehydrogenase menschlicher Organe:
Biochem. Z. 334, 185 - 198 (1961).

39. Pfleiderer, G. und E.D. Wachsmuth
Die Heterogenität der Laktatdehydrogenase in der Enzwicklungsgeschichte und Pathologie des Menschen:
Klin. Wschr. 39, 352 - 354 (1961).

40. Prankerd, T.A.J.
Inborn errors of metabolism in red cells of congenital hemolytic anemias:
Am. J. Med. 22, 724 ff. (1957).

41. Prankerd, T.A.J.
Studies on the pathogenesis of haemolysis in hereditary spherocytosis:
Quart. J. Med. 29, 160 ff. (1960).

42. Prankerd, T.A.J.
The nature of the erythrocyte defect and the hemolytic mechanism in hereditary nonspherocytosis and heriditary nonspherocytic hemolytic anaemia:
Hämolyse und hämolytische Erkrankungen
(7. Freiburger Symposion 1959) hrsgg. v. H. Schubothe
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1961, S. 136 - 143.

43. Pyruvatkinase in:
Bergmayer, H.U.
Methoden der enzymatischen Analyse, 996 - 997,
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1962).

44. Pyruvatkinase in:
Rauen, H.M.
Biochemisches Taschenbuch Teil II, 696. 2. Auflage
Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg-New Yord (1964)

45. Rauen, H.M.
Biochemisches Taschenbuch, Teil II, 50 - 54 und 90 - 104.
2. Auflage (1964).

46. Rhodewald, M. in
Hoppe-Seyler/Thierfelder
Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-chemischen Analyse,
Bd. VI B, 540 - 543, 10. Auflage.

47. Rüdiger, H.W., K.G. Blume, G.W. Löhr und A. Schalhorn
Elektrophoretische Trennung der Isoenzyme der Glutathionreduktase und Pyruvatkinase menschlicher Erythrozyten:
Klin. Wschr. 46, 397 - 398 (1968).

48. Selwyn, J.G. and J.V. Dacie
Autohemolysis and the changes resulting from the incubation in vitro of red cells with congenital hemolytic anemia:
Blood 9, 414 - 438 (1954).

49. Tanaka, K.R., W.N. Valentine and S. Miwa
Pyruvate kinase deficiency hereditary nonspherocytic hemolytic anemia:
Blood 19, 267 - 295 (1962).

50. Tanaka, K.R. and W.N. Valentine
Pyruvate kinase deficiency:
Int. Symp. on Hered. Disord. of Erythr. Metab., 229 - 241
Ed. E. Beutler, New York and London (1968).

51. Tietz, A. and S. Ochoa
"Fluorokinase" and pyruvic kinase:
Arch. biochem. biophys. 78, 477 - 493 (1958).

52. Townes, P.L.
Diskussionsbemerkung in
Int. Symp. on Hered. Disord. of Erythr. Metab., 259 - 262
Ed. E. Beutler, New York and London (1968).

53. Twomey, J.J., F.B.O'Neal and R.H. Moser
ATP-metabolism in pyruvate kinase deficient erythrocytes:
Blood 30, 576 - 586 (1967).

54. Valentine, W.N., K.R. Tanaka and S.Miwa
75th Ann. Meeting Assoc. Amer. Physicians, Atlantic City N.Y. (1962).

55. Waller, H.D. and G.W. Löhr
Hereditary nonspherocytic enzymopenic hemolytic anemia with pyruvate kinase deficiency:
Proc. 9th Congress Int. Soc. Hematol., Mexico City (1962).

56. Waller, H.D. und G.W. Löhr
Genetische Enzymdefekte in der Glykolyse als Ursache nichtspherocytärer hämolytischer Anämien:
Nova Acta Leopoldina N.F. 26, 163 - 176 (1963).

57. Warner, R.C.
Physical properties of crystalline "Fluorokinase":
Arch. Biochem. Biophys. 78, 494 - 496 (1958).

58. Washio, S., Y. Mano and N. Shimazono
Purification and assay method of pyruvate kinase from baker's yeast:
J. biochem. 46, 1661 - 1663 (1959).

59. Wieland, T. und G. Pfleiderer
Nachweis der Heterogenität der Milchsäuredehydrogenasen verschiedenen Ursprungs durch Trägerelektrophorese:
Biochem. Z. 329, 112 - 116 (1957).

60. Wieland, T. und G. Pfleiderer
Analytische und mikropräparative Trägerelektrophorese mit höheren Spannungen:
Angew. Chem. 67, 257 - 260 (1955).

61. Wieland, T. und G. Pfleiderer
Neuere Anwendungen der Hochspannungselektrophorese:
Angew. Chem. 69, 199 - 204 (1957).

62. Wieland, T. und G. Pfleiderer
Über die Verschiedenheit der Milchsäuredehydrogenasen.
III. Vergleiche der Milchsäuredehydrogenasen aus verschiedenen Rattenorganen:
Biochem. Z. 331, 103 - 109 (1959).

Abb. 1: E 122 A: Es wurde 7 µl gelöster $(NH_4)_2SO_4$-Niederschlag aufgetragen. Puffer: $HBO_3/Na_2B_4O_7$, pH 8, 9; 0, 5 m. Spannung 1250 V, Dauer 90 min. Fluoreszenz-Photographie. Rechts im Bild liegt die Anode. Ganz rechts stellt sich als schmaler Streifen das HB dar; in der Mitte liegt als breiter grau-schwarzer Streifen die gewanderte PK-Fraktion, während links an der durch 2 senkrechte Striche gekennzeichneten Startlinie die schmale liegen gebliebene Fraktion der PK zu erkennen ist.

Abb. 2: E 272 a: 8, 5 µl Hämolysat A. Sch. Puffer: Veronal-Na/HCl pH 9, 0; I = 0, 04; Spannung 1500 V. Dauer 90 min. Fluoreszenz-Photographie. Das Hämoglobin wanderte deutlich in Richtung Anode, während die PK praktisch an der Startlinie liegen blieb.

Abb. 3: E 221 A: 8 µl Hämolysat von A. Sch. Phosphat-Puffer pH 7, 6; Ionenstärke 0, 10. Spannung 1000 V. Dauer 75 min. Fluoreszenz-Photographie. Anode rechts. An der Startlinie, gekennzeichnet durch 2 senkrechte Striche am oberen und unteren Rand der Folie, ist die PK als grau-schwarze Bande zu erkennen. Links von der PK, also kathodenwärts, das in 2 Fraktionen aufgeteilte Hämoglobin als massiver schwarzer Fleck mit schleierartiger, mehr kathodenwärts gelaufener Unterfraktion.

Abb. 4: E 216 B: 6 µl Hämolysat von H. Cre.
Phosphatpuffer pH 7, 6; Ionenstärke 0, 05. Spannung 1500 V. Dauer 90 min. Fluoreszenz-Photographie. Anode rechts. Eine Bande der PK ist praktisch an der Startlinie liegen geblieben und zeigte höchstens eine geringe Wanderung in Richtung Anode. Eine zweite PK-Bande lief deutlich kathodenwärts. Noch weiter links lieht man breit und schlierig das HB. DEUTLICHE TRENNUNG DER PK IN 2 BANDEN!

Abb. 5: E 172: 5 µl Hämolysat von A. Sch.
Phosphat-Puffer pH 6, 0; Ionenstärke 0, 05. Spannung 1000 V. Dauer 105 min. Fluoreszenz-Photographie. Die PK-Bande an der Startlinie ist etwas mit der Vorderfront, die gut bewegliche PK-Fraktion dagegen mit der Vorderfront 37 mm und der Hinterfront 25 mm in Richtung Kathode gelaufen. Das Hämoglobin ist bereits weit nach links gewandert. Deutliche Trennung der PK in 2 Banden.

Abb. 6: E 285 A: 7 µl Hämolysat von A. Sch.
Phosphat-Puffer pH 5, 5; Ionenstärke 0, 05. Spannung 1500 V. Dauer 75 min. Fluoreszenz-Photographie. Beschreibung der Ergebnisse siehe Text. Deutliche Trennung der PK in 2 Banden.

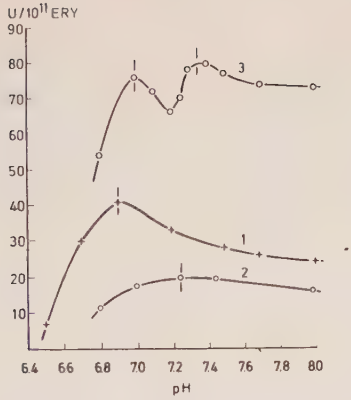

Abb. 7: pH-Abhängigkeit der Pyruvatkinase. 1 bei normaler PK-Aktivität, 2 bei erniedrigter PK-Aktivität, 3 bei erhöhter PK-Aktivität (5).

Abb. 8: E 366 B: 15 µl Hämolysat des heterozygoten Defektträgers Gerhard W.. Phosphat-Puffer pH 5, 5; Ionenstärke 0, 05. Spannung 1500 V. Dauer 85 min.. Beschreibung im Text.

Abb. 9: E 331 A: 9, 5 µl Hämolysat des heterozygoten Defektträgers Horst W.. Phosphat-Puffer pH 5, 5; I = 0, 05. Spannung 1500 V. Dauer 75 min.. Beschreibung im Text.

Abb. 10: E 363 B: 22 µl !!! Hämolysat der heterozygoten Defektträgerin Marion W.. Phosphat-Puffer pH 5, 5; I = 0, 05. Spannung 1500 V. Dauer 90 min.. Fluoreszenz-Photographie.

Abb. 11: E 364 A: 15 µl Hämolysat des homozygoten Defektträgers Günther W. Phosphat-Puffer pH 5, 5; Ionenstärke 0, 05. Spannung 1500 V. Dauer 90 min.. Fluoreszenz-Photographie. Erklärung siehe Text.

Lebenslauf

Ich, Andreas Schalhorn, wurde am 8.4.1942 als jüngstes von 4 Kindern des Amtsgerichtsrats Adalbert Schalhorn in Berlin geboren. Im April 1948 wurde ich in Oberhausen-Sterkrade eingeschult. 1952 trat ich in das dortige Neusprachliche Gymnasium ein. Als mein Vater an das Amtsgericht Ratingen bei Düsseldorf versetzt wurde, wechselte ich auf das dortige Neusprachliche Gymnasium und bestand dort im März 1961 mein Abitur. Ich fing dann in Münster/Westfalen mit dem Medizinstudium an und legte im Frühjahr 1962 mein Vorphysikum und im Oktober 1963 mein Physikum ab. Die klinischen Semester studierte ich dann an der Universität in Tübingen. Hier machte ich auch von 1964 bis 1966 die Versuche zu meiner Doktorarbeit. Am 31.1.1967 legte ich die Prüfungen zum Staatsexamen ab.